



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO DE *Miconia albicans* (Sw.) Triana
(MELASTOMATACEAE)**

IZABELLY VIEIRA SANTOS
LUZI PAULA DA SILVA MARINS COUTO

SÃO CRISTOVÃO-SE
2018

IZABELLY VIEIRA SANTOS
LUZI PAULA DA SILVA MARINS COUTO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO DE *Miconia albicans* (Sw.) Triana
(MELASTOMATACEAE)**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito para conclusão de curso.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Francilene Amaral da Silva
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Tamires Cardoso Lima

SÃO CRISTOVÃO-SE
2018

IZABELLY VIEIRA SANTOS
LUZI PAULA DA SILVA MARINS COUTO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO DE *Miconia albicans* (Sw.) Triana
(MELASTOMATACEAE)**

Área de concentração: Ciências da Saúde/Farmácia

Data da defesa: 27/09/2018

Resultado: _____

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Francilene Amaral da Silva

Co orientadora: Prof.^a Dr.^a Tamires Cardoso Lima

Prof. MSc. Anderson Ribeiro dos Santos

Prof. Fernando Henrique Oliveira de Almeida

RESUMO

Miconia albicans (Sw) Triana (Melastomataceae) é conhecida popularmente como “canela-de-velho” e é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrose, dores articulares em geral e como anti-inflamatória. Algumas propriedades farmacológicas dessa espécie já foram comprovadas cientificamente, incluindo atividades antitumoral, antimicrobiana e analgésica. No entanto, ainda são necessários mais estudos no intuito de compreender melhor o potencial biológico dessa espécie vegetal. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, do extrato seco de *M. albicans* (ESMA). Na caracterização química foi feita uma triagem fitoquímica preliminar além da determinação do teor total de fenóis e flavonoides totais. Para avaliação do efeito antioxidante foram realizados testes frente aos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS), além da inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e investigação do potencial reducional do ferro (FRAP). Os resultados antioxidantes foram expressos como média \pm SEM e analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p<0,05$). A prospecção fitoquímica indicou a presença de taninos, flavonoides, saponinas, leucoantocianidinas, esteroides e terpenos na espécie *M. albicans*. O ESMA apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 551,300 \pm 3,72 mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato, enquanto que para o teor de flavonoides foi obtido um resultado de 367,193 \pm 10,52 mg de equivalente de catequina/g de extrato. O ESMA apresentou atividade antioxidante frente a todos os métodos utilizados. No ensaio frente ao radical DPPH, o ESMA apresentou uma Cl_{50} = 33,8651 μ g/mL, resultado superior ao controle positivo Trolox. No ensaio frente ao radical ABTS, o ESMA foi capaz de reduzir o radical em 80% na menor concentração testada (1 μ g/mL). Na inibição da peroxidação lipídica, o ESMA apresentou uma Cl_{50} de 1338,34 μ g/mL. Por fim, no ensaio de potencial reducional do ferro, o ESMA apresentou um potencial redutor significativo a partir da concentração de 10 μ g/mL. Esses resultados evidenciam que a espécie estudada possui atividade antioxidante e esse efeito pode ser atribuído, ao menos em parte, ao teor de fenólicos presentes em sua composição, especialmente os flavonoides.

PALAVRAS-CHAVE: *M. albicans*, extrato seco, fenólicos, flavonoides, antioxidante.

ABSTRACT

Miconia albicans (Sw) Triana (Melastomataceae) is popularly known as "canela-de-velho" and is used in folk medicine for the treatment of arthrosis, pain in general and as anti-inflammatory. Some pharmacological properties of this species have already been scientifically proven, including antitumor, antimicrobial and analgesic activities. However, further studies are needed in order to better understand the biological potential of this plant species. Thus, the objective of the present study was to characterize chemically as well as to evaluate the antioxidant activity, *in vitro*, of the dry extract of *M. albicans* (DEMA). In the chemical characterization, a preliminary phytochemical screening was carried out in addition to determination of the phenols and flavonoids total content. In order to evaluate the antioxidant effect, tests were performed on 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radicals, as well as inhibition of lipid peroxidation (TBARS) and iron reduction potential (FRAP). The antioxidant results were expressed as mean \pm SEM and analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test ($p < 0.05$). Phytochemical prospecting indicated the presence of tannins, flavonoids, saponins, leucoantocyanidins, steroids and terpenes in *M. albicans* species. DEMA had a total phenols content of 551.300 \pm 3.72 mg of gallic acid equivalent/ g of extract, whereas for total flavonoid content was obtained a result of 367.193 \pm 10.52 mg of catechin equivalent/g of extract. The DEMA presented antioxidant activity against all the methods used. In the assay against the DPPH radical, the DEMA presented an IC₅₀ = 33.8651 μ g/mL, a result superior to the Trolox (positive control). In the ABTS radical assay, DEMA was able to reduce the radical by 80% at the lowest concentration tested (1 μ g/mL). In inhibition of lipid peroxidation, DEMA showed an IC 50 of 1338.34 μ g/mL. Finally, in the iron reduction potential test, DEMA showed a significant reduction potential at the concentration of 10 μ g/mL. These results show that the species studied has antioxidant activity and this effect can be attributed, at least in part, to the phenolic content present in its composition, especially the flavonoids.

KEYWORDS: *M. albicans*, dry extract, phenols, flavonoids, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana.....	15
Figura 2. Estrutura química de alguns metabólitos secundários isolados da espécie <i>M. albicans</i>	15
Figura 3. Atividade antioxidante do ESMA na eliminação do radical DPPH.....	30
Figura 4. Atividade antioxidante do ESMA na eliminação do radical ABTS.....	32
Figura 5. Atividade antioxidante do ESMA pelo potencial redutor de ferro.....	33
Figura 6. Potencial de lipoperoxidação do ESMA.....	35

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Atividades biológicas já descritas para a espécie *M. albicans*16

Tabela 1. Resultados da prospecção fitoquímica preliminar realizada com o extrato seco de *M. albicans*.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - ácido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE - Herbário da Universidade Federal de Sergipe

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAG - Equivalente de ácido gálico

ECAT - Equivalente de Catequina

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ESMA - Extrato seco de *M. albicans*

FRAP - Potencial reducional de ferro

CI₅₀ - Concentração inibitória 50%

NUDDATEF - Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnologia de Fitoterápicos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

SEMA - Solução Extrativa de *M. albicans*

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1.	Plantas medicinais.....	13
2.2.	Família Melastomataceae	13
2.3.	Gênero <i>Miconia</i>	14
2.4.	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana.....	14
2.5.	Atividade antioxidante	17
2.6.	Turboextração	18
2.7.	Secagem por nebulização (<i>spray drying</i>)	18
3.	OBJETIVOS	20
3.1.	Objetivo Geral.....	20
3.2.	Objetivos Específicos	20
4.	METODOLOGIA.....	21
4.1.	Coleta e identificação botânica do material vegetal.....	21
4.2.	Obtenção da Solução Extrativa	21
4.3.	Obtenção do extrato seco de <i>M. albicans</i> (ESMA)	21
4.4.	Triagem Fitoquímica.....	22
4.4.1.	Pesquisa de alcaloides.....	22
4.4.2.	Identificação de quinonas (Reação de Borntrager Direta).....	22
4.4.3.	Taninos	22
4.4.4.	Identificação de flavonoides	23
4.4.5.	Identificação de glicosídeos saponínicos	23
4.4.6.	Pesquisa de Leucoantocianidinas	24
4.4.7.	Pesquisa de esteroides e triterpenos (Reação de Lieberman-Bouchard)	24
4.5.	Determinação do teor de fenólicos totais no ESMA	24
4.6.	Determinação do teor de flavonoides totais no ESMA	24
4.7.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do ESMA.....	25
4.7.1.	Capacidade antioxidante por eliminação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH●)	25
4.7.2.	Capacidade antioxidante pela eliminação do radical livre ABTS● ⁺ (ácido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)	25
4.7.3.	Método do potencial reducional do ferro (FRAP)	26
4.7.4.	Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	27
4.8.	Análise estatística.....	27

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1.	Caracterização química do ESMA.....	28
5.1.1.	Triagem Fitoquímica.....	28
5.1.2.	Determinação do teor de fenólicos totais	29
5.1.3.	Determinação do teor de flavonoides totais	30
5.1.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do ESMA.....	31
5.2.1.	Capacidade antioxidante por eliminação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH●)	31
5.2.2.	Capacidade antioxidante pela eliminação do radical livre ABTS● ⁺ (ácido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)	32
5.2.3.	Método do potencial reducional do ferro (FRAP)	34
5.2.4.	Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	35
6.	CONCLUSÃO.....	37
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta em número de espécies de animais, micro-organismos e plantas, ocupando a primeira posição no *ranking* dos 17 países megadiversos do mundo. Essa imensa variedade de espécies vegetais aliada a facilidade de acesso e o seu baixo custo contribuem para que a maioria da população faça uso de plantas com fim medicinal para o tratamento de inúmeras doenças (SERPELONI et al., 2008).

Os registros do uso de plantas para a profilaxia e/ou cura de enfermidades são datados da era paleolítica. Com as grandes navegações e a descoberta de novos continentes, os europeus que desembarcaram no Brasil depararam-se com a utilização de um grande número de plantas medicinais pelos povos indígenas nativos. Assim, os conhecimentos da flora local foram unidos aos conhecimentos trazidos da Europa e da África. Desde então, o conhecimento popular sobre a utilização de plantas para a manutenção e/ou reestabelecimento da saúde tem sido transmitido ao longo das gerações de forma oral (FLOR & BARBOSA, 2015; GIRALDI & HANAZAKI, 2010).

Entretanto, apesar da vasta diversidade da flora e da larga utilização das plantas medicinais para diversos fins pela população brasileira, ainda carecem estudos mais aprofundados a respeito da constituição fitoquímica e potencial biológico de uma variedade de espécies (DUTRA et al., 2016; PANDEY & DOERKSEN, 2016).

Com o início da industrialização e o aumento da urbanização no Brasil, o uso de medicamentos sintéticos e industrializados começou a se intensificar e, como reflexo, as plantas medicinais começaram a ser negligenciadas. Atualmente, esse cenário tem sofrido mudanças vem sendo observada uma crescente redescoberta do valor curativo das plantas medicinais. A população tem recorrido a tratamentos mais saudáveis e mais baratos para combater uma diversidade de doenças (FLOR & BARBOSA, 2015; LORENZI & MATOS, 2008; PEREIRA et al., 2015).

A importância das plantas medicinais no desenvolvimento de medicamentos novos e terapeuticamente mais eficazes tem sido incentivada por meio da adoção de diferentes políticas públicas. Em 2006, foi aprovada no Brasil, por meio do Decreto nº 5.813 de 22 de junho, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Essa política teve como objetivo estabelecer diretrizes para

o desenvolvimento de ações que visem garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos à população brasileira, fortalecer o desenvolvimento de tecnologias e inovações bem como promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira (PEREIRA et al., 2015; BRASIL, 2006).

Miconia albicans (Sw.) Triana é uma planta natural da região Nordeste do Brasil. Conhecida popularmente como “canela-de-velho”, essa espécie é amplamente empregada na medicina popular para o tratamento de artrose, artrite reumatoide, dor, inflamação das articulações e para purificação do sangue, sendo utilizada tanto internamente (na forma de infusão) como externamente (aplicação nas áreas afetadas) (OLIVEIRA et al., 2015; ALLENSPACH et al., 2012)..

Em fevereiro de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu, por meio da resolução RE nº 400 de 16 de fevereiro de 2017, a fabricação, distribuição e comercialização do medicamento “canela-de-velho”. Esse produto era comercializado com a “promessa” de ser a cura milagrosa para a artrose, no entanto, o mesmo não possuía registro, cadastro ou notificação na agência. Segundo a ANVISA, o produto “canela-de-velho”, que continha em sua formulação a planta *M. albicans*, porém, não possuía informações suficientes sobre qual a parte da planta era utilizada para a produção dos chás, entre outras informações. Esse fato enfatiza a importância da implantação da PNPMF e outras políticas, principalmente no que diz respeito ao acesso seguro e uso racional das plantas medicinais (ANVISA, 2017).

Apesar do seu potencial terapêutico e ser comumente empregada na medicina popular, *M. albicans* ainda é pouco estudada do ponto de vista químico e farmacológico. Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de pesquisas no intuito de fornecer mais informações sobre o potencial farmacológico dessa espécie, assegurando, assim, o uso seguro dessa espécie pela população.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Plantas medicinais

As plantas medicinais foram o primeiro recurso terapêutico utilizado pela população na manutenção e/ou recuperação da saúde. A prática da sua utilização é datada de milhares de anos antes de Cristo (a.C.), no entanto, a busca pelos princípios ativos presentes nas plantas teve início apenas no século XIX (DUTRA et al., 2016; GIRALDI & HANAZAKI, 2010).

Segundo definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais são aquelas que possuem, em um ou vários dos seus órgãos, substâncias com propriedades profiláticas e/ou terapêuticas e seu uso no Brasil é regulamentado pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2006).

2.2. Família Melastomataceae

Melastomataceae pertence a ordem das Myrtales e é a sexta família botânica mais abundante dentre as angiospermas no Brasil. Abrange cerca de 5.000 espécies que estão distribuídas em aproximadamente 200 gêneros, sendo que os gêneros *Miconia* Ruiz & Pav., *Leandra* Raddi e *Tibouchina* Aubl. são os mais representativos (SERPELONI et al., 2008; GOLDENBERG et al., 2012).

As espécies dessa família apresentam uma grande diversidade de habitats, sendo mais comum espécies arbóreas, o que faz com que elas consigam se desenvolver nos mais variados tipos de ambientes. As plantas que representam essa família possuem folhas decussadas com nervação acródroma, estames geralmente falciformes e anteras poricidas (ROMERO & MARTINS, 2002).

Essa família botânica é encontrada predominantemente em regiões pantropicais, com concentração de espécies no Novo Mundo, distribuindo-se por todo o território brasileiro, desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Entretanto, é mais comum nas regiões da Amazônia, Cerrado – onde ocorre a maioria dos gêneros todos com frutos capsulares – e Mata Atlântica (GOLDENBERG et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2013; ROMERO & MATINS, 2002).

2.3. Gênero *Miconia*

O gênero *Miconia* é típico da América tropical, se estendendo desde o sul do México até o norte do Uruguai e Argentina. É constituído por cerca de 1.000 espécies, sendo o gênero mais diverso da família Melastomataceae. No Brasil possui aproximadamente 274 espécies, as quais são distribuídas por todo o território, principalmente nas florestas úmidas (RODRIGUES et al., 2010; SERPELONI et al., 2008).

As espécies pertencentes a esse gênero normalmente se apresentam sob a forma de arbustos ou pequenas árvores que podem chegar de 4 a 5 metros de altura, apresentando troncos lisos de cor castanha com córtex delgado, um grau variável de tipos e densidades de tricomas. As folhas são lâminas inteiras ou dentadas, geralmente com pecíolo. Já as flores são andróginas, diclamídeas e actinomorfas. O fruto, por sua vez, é uma baga com tamanho variável, pericarpo delgado, com pouca ou nenhuma polpa sucosa envolvendo as sementes (CHAGAS, 2012).

Estudos realizados com infusões, extratos e compostos isolados de espécies desse gênero tem reportado várias atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antimalárica, antitumoral e analgésica. Já investigações fitoquímicas resultaram no isolamento das seguintes classes de metabólitos secundários: triterpenos, taninos, cumarinas, flavonoides, quinonas e outros compostos fenólicos (RODRIGUES et al., 2011; PIERONI, 2011; CUNHA et al., 2010; VASCONCELOS, 2006; CELOTTO et al., 2003; HASRAT et al., 1997; CUNHA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2008).

2.4. *Miconia albicans* (Sw.) Triana

M. albicans (**Figura 1**) é uma das espécies mais comuns do gênero *Miconia*. Trata-se de um arbusto que pode atingir uma altura de 1 a 4 metros, com sementes que possuem cotilédones foliáceos, praticamente sem reservas. A espécie é capaz de produzir sementes sem polinização. Possui folhas simples, opostas, discolores, com nervuras secundárias paralelas e margem levemente denteada. Apresenta pequenos e numerosos frutos rosados, em forma de baga, que mudam de cor ao amadurecer e apresentam alto teor de água e carboidratos, porém, poucas proteínas (OLIVEIRA et al., 2015; ALLENSPACH et al., 2012).

Com relação a sua distribuição, é encontrada nas savanas e florestas tropicais brasileiras, na vegetação secundária do cerrado, afloramentos rochosos e formações costeiras (OLIVEIRA et al., 2015). *M. albicans* é conhecida pela população como “canela-de-velho”, “folha-branca”, “pau-de-tucano” e é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrose, artrite, dores articulares em geral e como anti-inflamatória para o tratamento de distúrbios intestinais (ALLENSPACH et al., 2012; REIS, 2004).



Figura 1. Espécie *Miconia albicans* (Sw.) Triana.
Fonte: Autoras.

Atualmente na literatura existem poucos estudos a respeito dessa espécie. Os estudos realizados previamente resultaram no isolamento de esteroides, triterpenos e flavonoides. A **Figura 2** apresenta as estruturas químicas de alguns compostos isolados de *M. albicans* (PIERONI et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2006).

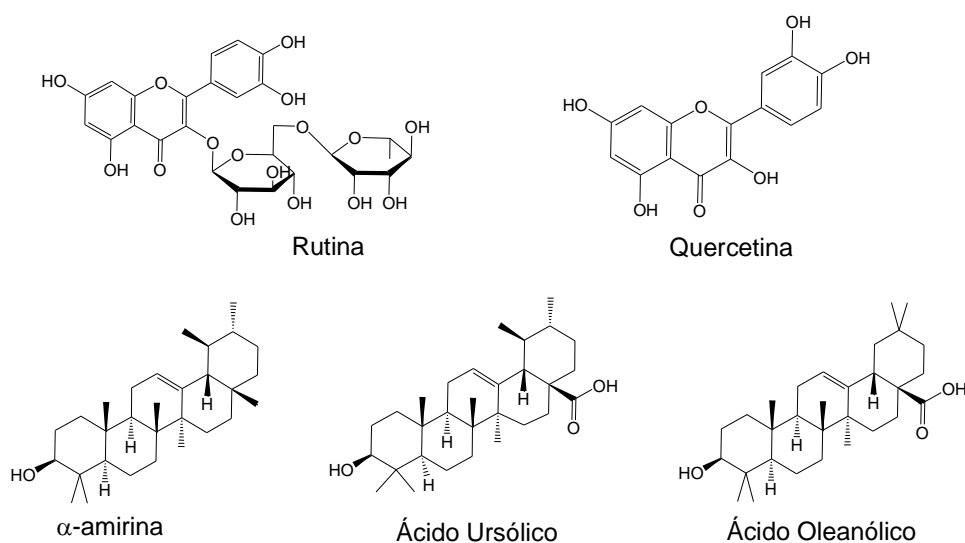


Figura 2. Estruturas químicas de alguns metabólitos secundários isolados da espécie *M. albicans*.

Além do isolamento de algumas substâncias químicas, alguns trabalhos desenvolvidos com *M. albicans* também descrevem algumas atividades biológicas da espécie, as quais são mostradas no quadro abaixo:

Quadro 1. Atividades biológicas já descritas para a espécie *M. albicans*.

Atividade biológica	Farmacógeno	Extrato/ Óleo essencial/ Composto isolado	Referências
Anticlastogênica	Folhas	Extrato metanólico	Serpeloni et al., 2008
Antioxidante	Folhas	Extrato metanólico	Pieroni et al., 2011
Antimicrobiana	Folhas	Extrato etanólico	Celotto et al., 2003
Analgésica	Folhas	Extrato diclorometano	Vasconcelos et al., 2006
Anti-inflamatória	Folhas	Extrato diclorometano	Vasconcelos et al., 2006
Efeito protetor ao DNA	Folhas	Extrato metanólico	Serpeloni et al., 2011
Antimutagênica	Folhas	Extrato metanólico	Serpeloni et al., 2008

Serpelloni e colaboradores (2008) avaliaram a genotoxicidade *in vivo* e os efeitos mutagênicos dos extratos metanólico e clorofórmico de *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*. Para tal, foram realizados testes de micronúcleo, além da avaliação de um possível efeito protetor desses extratos frente a ciclofosfamida. Nesse estudo, todos os extratos apresentaram atividade protetora e o extrato metanólico de *M. albicans* apresentou maior redução da mutagenicidade quando comparado com o extrato clorofórmico.

Pieroni e colaboradores (2011) investigaram o teor de fenóis e a atividade antioxidante do extrato metanólico de *M. albicans* e sua fração *n*-butanólica. No teste de fenóis totais para o extrato metanólico foi observado um valor de $70,04 \pm 0,12$ mg EAG/g de extrato seco. O teste de APPH na fração *n*-butanólica do extrato demonstrou um efeito protetor contra a hemólise dos eritrócitos na concentração de 0,59 mg/mL. O resultado do ensaio DPPH demonstrou que as frações metanólica ($CI_{50} = 49,45 \pm 0,0050$) e butanólica ($CI_{50} = 7,72 \pm 0,0350$) do extrato conseguiram reduzir o radical DPPH quando comparadas aos padrões de rutina e quercetina.

Vasconcelos e colaboradores (2006) realizaram um estudo sobre a atividade anti-inflamatória dos ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO), compostos majoritários de *M. albicans*, utilizando o método do edema da pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados obtidos na administração oral de AU e AO nas doses de 40 mg/kg⁻¹ demonstraram uma atividade antiedematogênica, uma vez que houve inibição da constrição abdominal de maneira dose-dependente. Esse resultado foi similar ao do controle positivo (ácido acetilsalicílico). Entretanto, observou-se que com a administração da mistura de AU + AO (40 mg/kg⁻¹), houve apenas uma atividade moderada quando comparada com o efeito obtido usando os compostos individualmente, sugerindo que o efeito anti-inflamatório do extrato se deve a presença de outros compostos.

Serpelloni e colaboradores (2011) avaliaram a mutagenicidade e os efeitos protetores dos extratos metanólicos de espécies de *Miconia* em culturas de células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79). O estudo foi feito utilizando um ensaio clonogênico para avaliar a capacidade do extrato de *M. albicans* de inibir essas culturas e observou-se que na concentração de 30 µg/mL o extrato apresentava um efeito citotóxico sobre as células.

2.5. Atividade antioxidante

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso organismo. Os radicais livres são espécies quimicamente instáveis com elétrons desemparelhados e são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados ERO e nos átomos de nitrogênio ERN (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2014).

Os radicais livres participam da produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, quando há excesso desses radicais no organismo – estresse oxidativo – ocorrem efeitos prejudiciais tais como peroxidação de lipídios de membrana, agressão as proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. O estresse oxidativo está relacionado a diversas patologias, tais como como artrite, disfunções cognitivas, câncer, entre outras, além de causar envelhecimento e morte celular (BARREIROS et al., 2006; ALVES et al., 2010)

Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas do efeito dos radicais livres no organismo. As substâncias antioxidantes retardam ou inibem a velocidade de oxidação de maneira eficaz e, conseqüentemente, reduzem os danos celulares causados pelas ERO e ERN, combatendo as doenças causadas por esses danos. Assim, o sucesso das investigações com substâncias antioxidante está diretamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano (PIETTA, 2000; VASCONCELOS et al., 2014).

2.6. Turboextração

A turboextração é um método de extrativo no qual a extração é feita por meio da agitação com redução do tamanho de partícula como consequência da força de cisalhamento de maneira que há o rompimento das células vegetais, o que facilita a dissolução das substâncias ativas. Sendo assim, nesse método há uma redução do tempo de extração para a ordem de minutos bem como o quase esgotamento da droga vegetal (SONAGLIO et al., 2003).

2.7. Secagem por nebulização (*spray drying*)

Um dos principais objetivos da secagem farmacêutica é a retirada da água a fim de se evitar proliferação microbiana, reações químicas e/ou fenômenos físicos (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). O processo de secagem por nebulização consiste basicamente em três etapas. Em princípio, o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Em seguida, há o contato dessas gotículas com uma corrente de ar quente no qual ocorre transferência de calor. Por fim, ocorre a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida. As partículas solidificadas normalmente apresentam o mesmo tamanho e forma da gotícula que as originou (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

A secagem por *spray drying* não apenas influencia as características físico-químicas e tecnológicas dos produtos obtidos como também os aspectos microbiológicos. Sendo assim, os extratos secos por aspersão são comumente empregados como produtos intermediários ou finais, principalmente nas formas farmacêuticas sólidas, devido à sua alta estabilidade química e microbiológica, facilidade de armazenamento e transporte além de se ter uma maior concentração

de constituintes químicos (SOARES et al., 2005; COSTA et al., 2009; OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante do extrato seco de *M. albicans* (ESMA).

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter uma solução extrativa de *M. albicans* (SEMA) por turboextração;
- ✓ Realizar a secagem da SEMA por *spray dryer*;
- ✓ Caracterizar quimicamente o ESMA;
- ✓ Determinar o conteúdo de fenólicos totais do ESMA;
- ✓ Determinar o teor de flavonoides totais do ESMA;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante, *in vitro*, do ESMA empregando diferentes métodos.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e identificação botânica do material vegetal

As folhas de *M. albicans* foram coletadas no Parque Nacional Serra de Itabaiana (Latitude: -10767192; Longitude: -37,337001; Altitude: 3642 m), localizado no município de Areia Branca, Sergipe, Brasil. O material vegetal foi coletado no dia 20/08/2017, às 8:00 hs. A identificação botânica da planta foi realizada pela Dra. Ana Paula Prata e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE), sob voucher de número ASE0039497.

4.2. Obtenção da Solução Extrativa

Esta etapa foi realizada no (Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnologia de Fitoterápicos – NUDDATEF-) no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pernambuco.

Após a coleta, o material vegetal fresco foi selecionado manualmente e submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas até estabilização da umidade residual. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas tipo Willey TE-680.

A solução extrativa foi obtida por turboextração, empregando EtOH 50% (v/v) como líquido extrator na proporção 1:10 (droga vegetal: solvente, p/v). Foi utilizado um liquidificador industrial de alta rotação LAR-2 no qual foram realizadas 6 extrações onde cada extração corresponde a 4 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 4 min entre cada ciclo. Ao final de todo o processo foram utilizados 300 g das folhas secas e trituradas de *M. albicans* e 3000 mL de EtOH 50% (divididos entre as 6 extrações). Em seguida, a solução foi filtrada em funil de Buchner com algodão (bomba a vácuo), obtendo-se ao final da filtração o total de 2240 mL de solução extrativa (SEMA).

4.3. Obtenção do extrato seco de *M. albicans* (ESMA)

Esta etapa também foi realizada no (Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnologia de Fitoterápicos – NUDDATEF-) no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pernambuco.

A solução extrativa obtida anteriormente foi submetida a secagem por nebulização (*spray-dryer*) para obtenção do extrato seco. Empregou-se o Aerosil®

200 na concentração 10% como adjuvante de secagem. As condições de secagem empregadas durante o processo foram: vazão 0,6 L/h, temperatura 140 °C, pressão de pulverização de 2 bar por um tempo de aproximadamente 4h. Ao final do processo foram obtidos 40,67g de extrato seco (ESMA).

4.4. Triagem Fitoquímica

A solução extrativa de *Miconia albicans* (SEMA) foi submetida à prospecção fitoquímica, segundo a metodologia descrita por MATOS (1997) e COSTA (2002), com o objetivo de detectar as principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie.

4.4.1. Pesquisa de alcaloides

A solução extrativa de *M. albicans* (1 mL) foi adicionada em tubos de ensaio e, em seguida, foram acrescentadas 5 gotas de HCl 1%. Por fim, adicionou-se 2 gotas dos seguintes reagentes: Dragendorff, Bertrand, Bouchardat e Mayer. Foi observada a formação de precipitado branco ou turvação para os reativos de Mayer e de Bertrand, precipitado cor tijolo para o reativo de Dragendorff e precipitado cor laranja para o reativo de Bouchardat.

4.4.2. Identificação de quinonas (Reação de Borntrager Direta)

Em um tubo de ensaio colocou-se 1 mL da SEMA e adicionou-se 5 mL de amônia diluída 10%. Após agitação, verificou-se a coloração da solução, sendo o resultado positivo caso houvesse mudança de coloração.

4.4.3. Taninos

Adicionou-se em cada tubo de ensaio 5 mL da solução extrativa de *M. albicans* para a realização de cada uma das reações descritas a seguir, onde observou-se a intensidade e tonalidade da coloração adquirida pela solução ou formação de precipitado após a adição do reagente.

✓ Reações com sais de ferro

A SEMA adicionou-se cerca de 5 mL de água e algumas gotas de solução de FeCl₃ 1% em água, observando a formação de precipitado e mudança de coloração.

✓ **Reação com acetato de chumbo**

Foram adicionadas a SEMA 5 gotas de solução aquosa de acetato de chumbo 10% e observou-se a formação e coloração do precipitado.

✓ **Reação com dicromato de potássio**

Adicionou-se 5 gotas de solução de dicromato de potássio a um tubo de ensaio contendo a solução extrativa de *M. albicans*.

4.4.4. Identificação de flavonoides

✓ **Reação de Shinoda**

Adicionou-se uma pequena quantidade de magnésio metálico e 1 mL de HCl concentrado a um tubo de ensaio contendo 2 mL da SEMA e, em seguida, foi observado se houve mudança de coloração.

✓ **Reação com hidróxidos alcalinos**

Adicionou-se 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M a 2 mL da SEMA e observou-se a formação de precipitado.

✓ **Reação com sais de ferro**

Foram adicionadas 3 gotas de solução de FeCl_3 1% em água a 5 mL da SEMA e, em seguida, foi observado a mudança de coloração (azul, verde, marrom ou vermelho).

4.4.5. Identificação de glicosídeos saponínicos

Em 10 tubos de ensaio enumerados e de iguais dimensões, foram adicionados 5 mL de água destilada, com exceção do primeiro tubo. Em seguida, colocou-se 5 mL da SEMA no primeiro tubo, 5 mL no segundo tubo e homogeneizou-se todo o conteúdo em ambos os tubos. Após, transferiu-se 5 mL desta solução para o terceiro tubo, misturando bem. Continuou-se o processo, em sequência, até o décimo tubo, sempre fazendo uso da mesma pipeta. Desprezou-se por fim, 5 mL da solução do último tubo. Então, agitou-se vigorosamente todos os tubos ao mesmo tempo, no sentido longitudinal durante 15 segundos. Após, o conjunto foi mantido em repouso durante 15 min. Por fim, observou-se qual dos tubos apresentou uma camada de espuma de 1 cm de comprimento.

4.4.6. Pesquisa de Leucoantocianidinas

A SEMA (10 mL) foi levado à secura em banho-maria e adicionou-se 5 mL de EtOH e 5 gotas de HCl concentrado em cada fração. O material foi aquecido até a ebulição. A redução da leucoantocianidinas (de coloração amarela) em antocianidina na presença de ácido clorídrico é confirmada pela formação da coloração vermelha.

4.4.7. Pesquisa de esteroides e triterpenos (Reação de Lieberman-Bouchard)

Nesse ensaio foram adicionados 5 mL de clorofórmio a 30 mL da SEMA e, em seguida, a mistura foi filtrada. A fração clorofórmica foi pipetada para 3 tubos de ensaio nos seguintes volumes: 0,1 mL; 0,5 mL e 1 mL. Após, completou-se todos os tubos até 2 mL de clorofórmio. Em capela foi realizada a reação de Lieberman-Bouchard, adicionando-se lentamente 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico aos tubos. Após, observou-se a formação de coloração rósea escura ou azul.

4.5. Determinação do teor de fenólicos totais no ESMA

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com metodologia descrita por SLINKARD e SINGLETON (1977), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A curva de calibração foi obtida utilizando seis concentrações de ácido gálico: 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 µg/mL.

Inicialmente, foram pipetados em uma microplaca 12,5 µL do ESMA (100 µg/mL), 200 µL de água destilada e 12,5 µL de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada. Após 3 min, foi adicionado 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio e a mistura foi novamente agitada. A microplaca foi incubada, no escuro, por uma hora e a leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 720 nm. Paralelamente, foi realizado um controle negativo (EtOH puro). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

4.6. Determinação do teor de flavonoides totais no ESMA

A determinação de flavonoides totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por DEWANTO et al. (2002), com adaptações. A leitura da

absorbância foi realizada em 510 nm, onde é observada a complexação entre os flavonoides e o átomo de alumínio, gerando um composto amarelo. Os resultados foram expressos como equivalentes de catequina (ECAT) por grama de amostra. A curva de calibração foi obtida utilizando seis concentrações de catequina: 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 µg/mL. Inicialmente, foram pipetados em uma microplaca 25 µL do ESMA (100 µg/mL), 100 µL de H₂O destilada e 7,5 µL NaNO₂ 5%. Após 6 min, adicionou-se lentamente 7,5 µL de AlCl₃ 10%. Após 6 min, foram acrescentados 100 µL de NaOH 4% e 10 µL de H₂O. A mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, foi realizado um controle negativo (EOH puro).

4.7. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do ESMA

4.7.1. Capacidade antioxidante por eliminação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

A avaliação da capacidade antioxidante pela eliminação do radical livre DPPH foi feita de acordo com metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BREST (1995), com adaptações. Em uma microplaca, foram pipetados 50 µL do ESMA (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) e 150 µL da solução radical DPPH. Em seguida, a mistura foi incubada por 30 min, no escuro, e a medida da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS Quimis. Paralelamente, foi preparado um branco (controle negativo) utilizando água destilada. Trolox (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) foi usado como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como CI₅₀ (valor da concentração inibitória 50%) e porcentagem de inibição do radical DPPH, calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{inibição DPPH} = 100 \times \left[\frac{(\text{controle} - \text{amostra})}{\text{controle}} \right]$$

4.7.2. Capacidade antioxidante pela eliminação do radical livre ABTS•+ (ácido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de ABTS 7 mM a partir da mistura de 96 mg de ABTS e 25 mL de água destilada. Em seguida, foi preparada

uma solução de persulfato de potássio 140 mM com 189,2 mg de persulfato de potássio e 5 mL de água destilada. A formação do radical livre ABTS●+ foi obtida pela adição de 5 mL da solução-estoque ABTS a 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi então incubada no escuro por 16 horas. A solução de ABTS foi diluída em espectrofotômetro (734 nm) até obtenção de uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm.

Em uma microplaca, foram pipetados 30 µL do ESMA (1, 3, 10 e 100 µg/mL) e 300 µL do radical ABTS. A mistura foi homogeneizada e a leitura foi realizada após 6 minutos de incubação, a 734 nm. Paralelamente, foi preparado um branco (controle negativo) utilizando EtOH. Trolox (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) foi usado como controle positivo (RE et al., 1999). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como CI_{50} (valor da concentração inibitória 50%) e porcentagem de inibição do radical ABTS, calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{inibição ABTS} = 100 \times \left[\frac{(\text{controle} - \text{amostra})}{\text{controle}} \right]$$

4.7.3. Método do potencial reducional de ferro (FRAP)

Inicialmente, o reagente FRAP foi preparado utilizando 10 mL de tampão de acetato (0,3 M), 1 mL (10%) de cloreto férrico (20 mM) e 1 mL (10%) de TPTZ 10 mM. Adicionalmente, também foi preparada uma solução de sulfato ferroso (2 mM).

Em uma microplaca, foram pipetados 9 µL da ESMA (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL), 27 µL de água destilada e 270 µL do reagente FRAP. A microplaca foi incubada no escuro a 37 °C por 30 min e a leitura foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro UV-VIS Quimis. Paralelamente, foi preparado um branco (controle negativo) utilizando tampão acetato. Trolox (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) foi usado como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata e foi gerada uma curva padrão de sulfato ferroso (12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 mM). A equação da reta foi usada para calcular o potencial redutor das amostras (BENZIE & STRAIN, 1996).

4.7.4. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dia antes da realização do experimento, os cérebros de rato foram perfundidos em salina (NaCl 0,9%) e homogeneizados em uma proporção de 1 g de tecido: 9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 4 °C, 800 giros durante 15 min. O sobrenadante obtido foi coletado e congelado a -80 °C. Em eppendorfs foram adicionados 100 µL de homogenato de cérebro de rato e 50 µL do ESMA (1, 3, 10, 30, 300 e 1000 µg/mL). A mistura foi incubada a 37 °C, em banho maria, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 0,37%. A mistura foi incubada, no escuro, durante 1 h a 85 °C em banho maria. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 500 giros por 15 min à temperatura ambiente. Por fim, foram pipetados 200 µL da solução final em uma microplaca e a leitura foi realizada a 532 nm.

O branco (controle negativo) foi preparado pipetando-se 50 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) e 100 µL de homogenato de cérebro de rato em um eppendorf. A mistura foi então incubada a 37 °C, em banho maria, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,37%. A mistura foi novamente incubada, no escuro, durante 1 h a 85 °C em banho maria. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 500 giros por 15 min em temperatura ambiente. Por fim, foram pipetados 200 µL da solução final em uma microplaca e a leitura foi realizada a 532 nm. Paralelamente, foi preparado um branco (controle negativo) utilizando tampão fosfato. Trolox (100, 300, 500 e 1000 µg/mL) foi usado como controle positivo. (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como CI_{50} (valor da concentração inibitória 50%) e porcentagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey, utilizando-se o software Prism 6.0 (GraphPad). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (Intervalo de confiança de 95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química do ESMA

5.1.1. Triagem Fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar para a identificação das principais classes de metabólitos secundários (alcaloides, antraquinonas, triterpenoides, flavonoides, saponinas e taninos) do ESMA foi realizada por meio de reações cromogênicas e formação de precipitado. Os resultados negativos indicam ausência ou baixa concentração do metabólito pesquisado, enquanto que os resultados positivos devem ser considerados como provável presença desses metabólitos (SIMÕES et al., 2007; MATOS, 1997). Os resultados da triagem fitoquímica são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Resultados da prospecção fitoquímica preliminar realizada com o extrato seco de *M. albicans*.

Classe química	Resultado
Alcaloides	-
Quinonas	-
Taninos	+
Flavonoides	+
Glicosídeos saponínicos	+
Leucoantocianidinas	+
Esteroides e terpenos	+

Legenda. (-) resultado negativo; (+) resultado positivo

Na pesquisa de alcaloides não foi observada a formação de precipitado com nenhum dos reagentes utilizados (Dragendorff, Mayer e Bouchardat), sugerindo que esta classe de metabólito provavelmente está ausente ou em baixas concentrações na espécie. Nesse estudo também foi obtido resultado negativo para a presença de quinonas (não houve o desenvolvimento de coloração avermelhada). Esses resultados corroboram o estudo de Scalco e Munhoz (2016), que também obtiveram resultados negativos em ambos os testes para o extrato metanólico de *M. albicans*.

Na pesquisa de taninos, a espécie *M. albicans* apresentou resultado positivo em todas as reações realizadas. Resultado similar também foi obtido no estudo de

Scalco e Munhoz (2016). Segundo esses autores, essa classe de metabólitos é uma das principais responsáveis pelas atividades biológicas da espécie. Em estudo realizado por Castrillón e Bedoya (2009), esses autores atribuem a atividade citotóxica dos extratos de espécies de *Miconia* aos taninos presentes nessas espécies.

Os testes para a identificação para flavonoides, triterpenoides e esteroides apresentaram resultado positivo para todos os ensaios realizados. Castrillón e Bedoya (2009) e Pieroni et al. (2011) também reportam a presença desses metabólitos em seus trabalhos. No entanto, Scalco e Munhoz (2016) obtiveram um resultado negativo na pesquisa de flavonoides. Esses diferentes resultados podem ser atribuídos aos diferentes solventes usados no processo extrativo (metanol e solução hidroalcoólica) ou a fatores edafoclimáticos (solo, temperatura, luminosidade, época e período de coleta).

No teste para identificação de saponinas, o resultado observado foi positivo. Todos os tubos apresentaram espuma persistente de, no mínimo, 1 cm de altura. Esse resultado foi diferente do obtido por Scalco e Munhoz (2016), provavelmente devido aos fatores descritos anteriormente.

No ensaio de leucoantocianidinas, o ESMA apresentou resultado positivo para a reação. Foi observada o surgimento de coloração avermelhada, evidenciando a redução da leucoantocianidinas (de coloração amarela) em antocianidina (Matos, 2009).

5.1.2. Determinação do teor de fenólicos totais

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico. Nesse reagente, o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) e apresenta coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No entanto, em presença de certos agentes redutores, tais como os compostos fenólicos, ocorre a formação dos complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, onde a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração dessas substância redutoras (OLIVEIRA et al., 2009). A equação da curva de calibração do ácido gálico obtida através de regressão linear está apresentada abaixo:

$$A = 0,0041C - 0,0143 \text{ (} r^2 = 0,999 \text{)}$$

O ESMA apresentou um teor de fenólicos totais de $551,300 \pm 3,72$ mg EAG/g de extrato. Em estudo anterior, Pieroni e seus colaboradores (2011) determinaram o teor de fenólicos totais no extrato metanólico das folhas de *M. albicans*. Esses autores encontraram um valor cerca de 7,8 vezes menos do que o obtido em nosso estudo ($70,04 \pm 0,12$ mg EAG/g de extrato). Essa diferença no teor de fenólicos totais pode ser justificada por duas razões: o solvente utilizado no processo extrativo bem como a técnica extrativa. Em nosso estudo foi utilizado EtOH 50% como líquido extrator, enquanto que no estudo realizado por Pieroni o líquido extrator foi MeOH. Com relação a técnica de extração, Pieroni et al. empregaram maceração e em nosso estudo foi utilizada a técnica da turboextração. Segundo alguns estudos, na técnica de turboextração ocorre uma intensa redução do tamanho da partícula devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento. A redução do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células vegetais favorece a rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga vegetal. Assim, podemos inferir que a técnica de extração turboextração e o solvente EtOH 50% são duas variáveis que favorecem a extração de maiores quantidades de compostos fenólicos.

5.1.3. Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação da quantidade de flavonoides totais por meio da espectrofotometria é uma técnica mais simples, fácil e barata. A análise é realizada na região da luz ultravioleta ou visível resultado das ligações duplas presentes nos anéis aromáticos (MARCUCCI, WOISKY, SALATINO, 2008; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2010).

Esse método consiste na complexação dos flavonoides presentes na amostra com o cátion alumínio (Al^{3+}) formando o complexo estável flavonoide- Al^{3+} o qual é de coloração amarela. A intensidade da cor do complexo formado é proporcional a quantidade de flavonoides presentes na amostra (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2010). O resultado foi calculado a partir da equação da curva de calibração da catequina, obtida por regressão linear, que está descrita logo a seguir:

$$A = 0,0019C + 0,0529; r^2 = 0,996$$

A concentração de flavonoides totais encontrada no ESMA foi de aproximadamente $367,193 \pm 10,52$ mg ECAT/g de extrato. Não foram encontrados na literatura dados a respeito da determinação do teor de flavonoides totais no extrato seco de *M. albicans*.

5.1. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do ESMA

5.2.1. Capacidade antioxidante por eliminação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

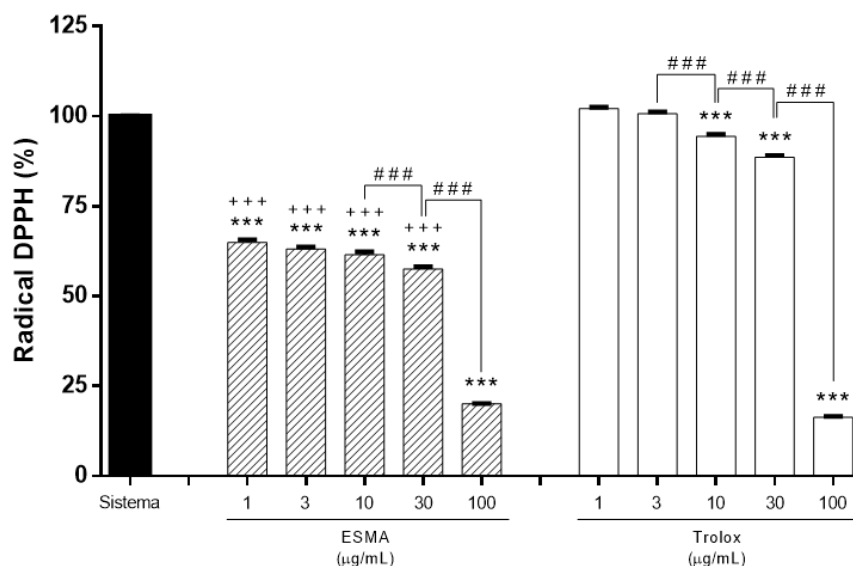
O ensaio por eliminação do radical DPPH mensura a capacidade de uma substância antioxidante em doar hidrogênios ao radical DPPH. Em sua forma estável, o radical DPPH possui coloração violeta. Na presença de substâncias redutoras ocorre a redução do mesmo e a mudança de coloração (amarela). Sendo assim, quanto mais grupamentos hidroxilas a amostra possuir, mais intensa será o surgimento da coloração amarela e maior o seu potencial antioxidante (TIVERON, 2010).

Os valores de percentual de inibição do radical DPPH• nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL estão representados na Figura 3. O ESMA foi capaz de reduzir a concentração inicial de radical DPPH a partir da concentração de 1 µg/mL quando comparadas ao sistema. No entanto, somente as concentrações de 3, 10 e 100 µg/mL apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando as amostras foram comparadas entre si. Já quando comparadas ao padrão Trolox, apenas a amostra de 100 µg/mL não apresentou diferença estatística. O controle positivo Trolox apresentou diminuição do radical DPPH a partir da concentração de 10 µg/mL quando comparado ao sistema e a partir da concentração de 3 µg/mL quando comparada ao ESMA.

O ESMA apresentou uma CI_{50} de 33,8651 µg/mL, enquanto o Trolox apresentou uma CI_{50} de 61,2284 µg/mL, o significa dizer que o extrato conseguiu reduzir a concentração de DPPH• em 50% numa concentração cerca de duas vezes menor a do Trolox. Pieroni e seus colaboradores (2011) realizaram um estudo da atividade antioxidante do extrato metanólico de *M. albicans* frente ao radical DPPH e encontraram um CI_{50} de $49,45 \pm 0,0050$ µg/mL. Comprando com nossos resultados, podemos perceber que ESMA revelou uma CI_{50} menor e, conseqüentemente, uma atividade antioxidante mais eficiente que o extrato

metanólico. Esse resultado pode ser justificado pela diferença no teor de fenólicos totais encontrados nos dois extratos. Em geral, o potencial antioxidante das espécies vegetais pode ser atribuído, ao menos em parte, a presença de substâncias fenólicas em sua composição química.

Figura 3. Atividade antioxidante do ESMA na eliminação do radical DPPH.



Os resultados expressam a média \pm desvio padrão dos valores de inibição *in vitro*. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. *** $p < 0,001$ vs. sistema (meio reacional sem antioxidante); ### $p < 0,001$ vs. as diferentes concentrações do ESMA; +++ $p < 0,001$ ESMA vs. Trolox. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

5.2.2. Capacidade antioxidante pela eliminação do radical livre ABTS•+ (ácido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)

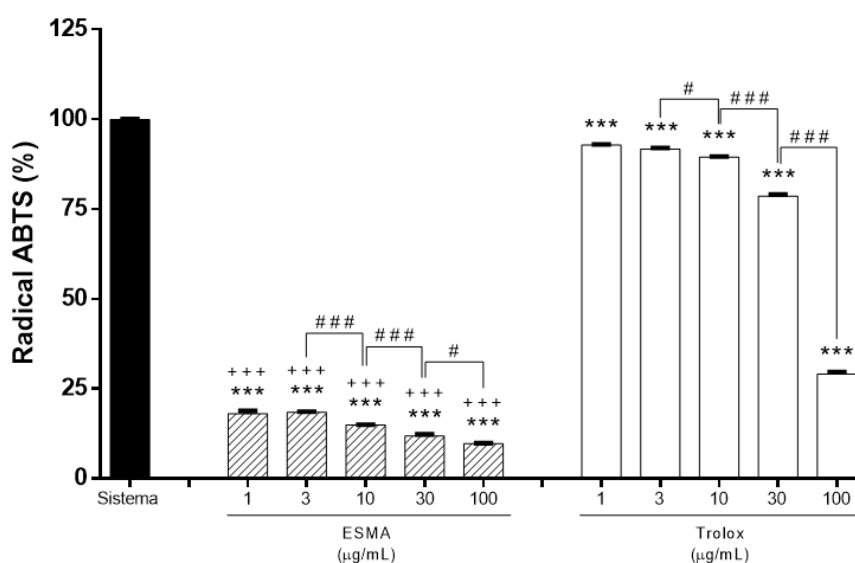
O radical ABTS pode ser gerado por enzimas como a peroxidase ou quimicamente, com dióxido de manganês ou persulfato de potássio. No ensaio pela captura do ABTS, esse radical quando entra em contato com um agente antioxidante recebe elétrons deste e, conseqüentemente, é reduzido. A medida em que a amostra antioxidante é misturada a radical ocorre a redução do mesmo, o que provoca a perda da coloração (azul) do meio reacional e decréscimo da absorbância. Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (VASCONCELOS et al., 2007).

O extrato seco de *M. albicans* apresentou atividade uma excelente atividade antioxidante frente a esse radical. Na **Figura 4** são apresentados os valores de

percentual de inibição do ABTS pelo ESMA nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL. Quando comparado ao sistema, o extrato conseguiu reduzir o radical ABTS em todas as concentrações testadas. Já quando as concentrações do extrato foram comparadas entre si, houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre todas elas, com exceção da concentração de 1 µg/mL. Quando comparado ao Trolox, o ESMA apresentou um melhor efeito em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,001$).

O Trolox conseguiu reduzir o radical ABTS em todas as concentrações avaliadas (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) e apresentou uma CI_{50} de 69,2940 µg/mL. Não foi possível determinar o CI_{50} do ESMA, pois na concentração de 1 µg/mL o mesmo já foi capaz de reduzir o radical ABTS em 80%.

Figura 4. Atividade antioxidante do ESMA *in vitro* na eliminação do radical ABTS



Os resultados expressam a média±desvio padrão dos valores de inibição *in vitro*. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. *** $p < 0,001$ do ESMA vs sistema (meio reacional sem o antioxidante). +++ $p < 0,001$ vs as diferentes concentrações do ESMA. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs concentrações do Trolox. *** $p < 0,001$ ESMA vs. Trolox. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

Araújo e colaboradores (2017) realizaram um estudo a respeito das atividades biológicas do extrato metanólico do pólen de abelha obtido de diferentes origens botânicas, dentre eles a espécie *M. albicans*. Nesse estudo, os autores concluíram que o extrato foi capaz de reduzir o radical ABTS, exibindo CI_{50} de $1,58 \pm 0,15$ µg/mL. Ainda, segundo os autores a atividade antioxidante dos pólenes

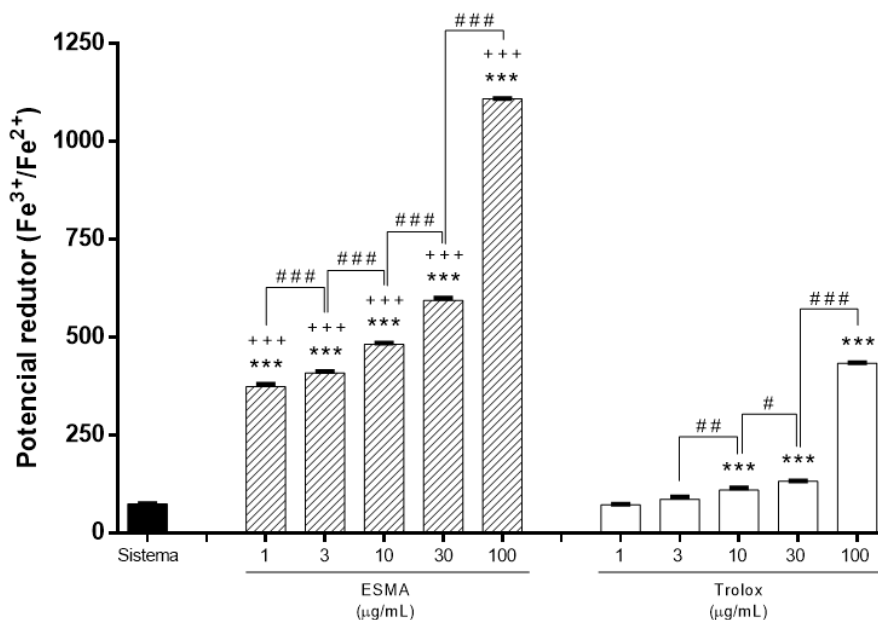
de abelha pode ser correlacionada aos compostos fenólicos presentes no pólen bem como devido à presença desses compostos na espécie que o pólen foi obtido.

5.2.3. Método do potencial reducional do ferro (FRAP)

O método FRAP baseia-se na redução do íon Fe^{3+} (forma férrica), presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPZZ), a Fe^{2+} (forma ferrosa). Essa redução leva a uma mudança de coloração do meio reacional que passa a ser um azul intenso. Sendo assim, quanto maior for a intensidade da coloração e/ou a absorbância, maior é o potencial antioxidante da amostra (URREA-VICTORIA et al., 2016).

Os valores de redução do ferro no ensaio do FRAP pelo ESMA para as concentrações estoque de 1, 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ estão apresentados na **Figura 5**. Os resultados foram expressos em forma de conversão do íon Fe^{3+} em íon Fe^{2+} (μmol de sulfato ferroso) e a curva padrão de sulfato ferroso gerada apresentou um $R^2=0,9957$.

Figura 5. Atividade antioxidante do ESMA pelo potencial redutor de ferro.



Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão dos valores de redução *in vitro*. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. *** $p<0,001$ vs. sistema (meio reacional sem antioxidante); # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ vs. entre concentrações (ESMA e Trolox); +++ $p<0,001$ ESMA vs Trolox. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

Os resultados do potencial antioxidante reducional do ferro pelo ESMA revelaram diferença estatística significativa ($p<0,001$) quando comparado ao sistema já a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, sendo observado esse potencial redutor em todas as concentrações testadas. Além disso, o efeito observado foi dependente da concentração, ou seja, a medida que a concentração do extrato aumenta o potencial redutor também aumenta. O Trolox apresentou diferença estatística quando comparado ao sistema apenas a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Ainda, houve uma diferença significativa ($p<0,001$) entre as concentrações testadas apenas para 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

NONO e colaboradores (2014) realizaram um estudo sobre a atividade antioxidante de diferentes extratos (aquoso, metanol, acetato de etila e *n*-butanol) das raízes de *Dissotis thollonii* (Melastomataceae). Esses autores obtiveram os seguintes valores de capacidade de redução do ferro: $0,30\pm0,01$ (extrato aquoso), $1,31\pm0,08$ (extrato metanol), $0,19\pm0,01$ (extrato acetato de etila) e $2,52\pm0,25$ $\mu\text{g/mL}$ (extrato *n*-butanol). A maior atividade antioxidante foi observada para o extrato *n*-butanol e a mesma foi atribuída a um possível sinergismo entre os derivados do ácido elágico e o β -sitosterol presentes nesse extrato.

5.2.4. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação (LPO) ocorre como consequência do estresse oxidativo celular, podendo ser usada como um indicador da ocorrência de estresse oxidativo. Em sistemas biológicos, a avaliação da LPO pode ser realizada através dos produtos gerados durante o processo. Um dos métodos mais utilizados para mensuração da LPO é através da detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a exemplo do malonaldeído. Para a realização do ensaio de LPO, pode ser utilizada gema de ovo, homogenato de cérebro de rato, entre outros, pois como essas amostras são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, as mesmas são susceptíveis ao processo de LPO (Lima e Abdalla, 2001).

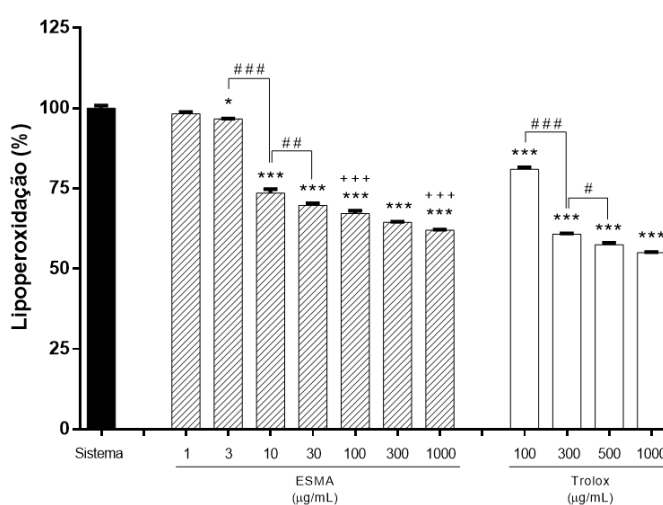
Os resultados da inibição da lipoperoxidação lipídica espontânea em homogenato cérebro de ratos pelo ESMA (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) estão apresentados na **Figura 6**. O ESMA conseguiu reduzir a lipoperoxidação lipídica em todas as concentrações avaliadas quando comparado ao sistema ($p<0,05$ ou $p<0,001$), com exceção da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Comparando as

diferentes concentrações do ESMA entre si. apenas as concentrações de 3, 10 e 30 µg/mL apresentam diferença significativa entre si ($p<0,01$ ou $p<0,001$). Quando comparadas ao padrão Trolox, apenas as concentrações 100 e 1000 µg/mL apresentam diferença estatística ($p<0,001$). O Trolox apresentou potencial de inibição em todas as concentrações (100, 300, 500 e 1000 µg/mL) quando comparado com o sistema ($p<0,001$).

O ESMA apresentou uma CI_{50} de 1338,34 µg/mL, enquanto o Trolox revelou uma CI_{50} de 1619,21 µg/mL, sugerindo que o ESMA foi capaz de inibir a lipoperoxidação em 50% em uma concentração menor que o controle positivo.

Um estudo realizado por ZAKARIA et al (2015) objetivou determinar os mecanismos gastroprotetores do extrato metanólico das folhas de *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) em ratos com úlcera gástrica induzida por etanol. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são bioprodutos da lipoperoxidação produzidos durante injúria oxidativa causada por etanol e podem ser usadas para avaliação da atividade gastroprotetora. Os resultados obtidos revelaram que o extrato foi capaz de reverter os altos níveis de TBARS na mucosa gástrica dos animais tratados, reduzindo, assim, a atividade de peroxidação lipídica. Ainda, o efeito antioxidante desse extrato pode ser atribuído a presença do flavonoide quercetina em sua composição química.

Figura 6. Potencial de inibição da lipoperoxidação do ESMA.



Os resultados expressam a média \pm desvio padrão dos valores de redução *in vitro*. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ vs. sistema sem antioxidante; # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ vs. entre concentrações (ESMA e Trolox); +++ $p<0,001$ ESMA vs. Trolox. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

6. CONCLUSÃO

Na caracterização química do extrato seco de *M. albicans* foi possível identificar a presença de flavonoides, taninos, saponinas, esteroides e triterpenos em sua composição. A determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides demonstrou que esses metabólitos estão presentes em elevada quantidade no extrato estudado. Em adição, a avaliação da atividade antioxidante revelou que o ESMA possui um elevado potencial antioxidante e essa atividade pode ser atribuída, ao menos em parte, a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, em sua constituição química. Mais estudos são necessários no intuito de avaliar outras atividades biológicas de *M. albicans*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.B.; AQUINO, F. G.; COSTA, L. C.; MIRANDA, Z. J. G.; SOUZA, S. R. Espécies de Melastomataceae Juss. com potencial para restauração ecológica de mata ripária no cerrado. México: **Polibotánica**, v. 35, 1-19 p, 2013.

ALLENSPACH, N. & DIAS, M. Frugivory by birds on *Miconia albicans* (MELASTOMATACEAE), in a fragment of cerrado in São Carlos, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 407–413, 2012.

ALVES CQ, DAVID JM, DAVID JP, BAHIA MV, AGUIAR RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**. 2010;33(10):2202-10.

ANVISA. Diretoria de controle e monitoramento sanitário. **Resolução RE nº 400, de 16 de fevereiro de 2017**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de fevereiro de 2017.

ARAÚJO, JS; CHAMBÓ, ED; COSTA, MAPC;CAVALCANTE DA SILVA, SMP;LOPES DE CARVALHO, CA;M. ESTEVINHO, L. Composição Química e Atividades Biológicas do Pólen de Abelha Mono- e Heterofloral de Diferentes Origens Geográficas. **Int. J. Mol.Sci.**2017, 18, 921.

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. 2006;29(1):113-23.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Série B - Textos Básicos de Saúde, 2006. 60p

CASTRILLÓN, I. A. L. E BEDOYA, C. D. V. Actividad Ictiotóxica de Extractos Polares y Apolares de Algunas Especies de los Géneros *Miconia*, *Clidemia* (Melastomataceae) y *Palicourea*, *Hamelia* (Rubiaceae). 2009, 159p. **Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad tecnológica de Pereira – Facultad de Tecnología – Escuela de Química**. Pereira, 2009.

CHAGAS, E. C. O. O gênero *Miconia Ruiz&Pav.* (Melastomataceae) na floresta atlântica do nordeste oriental. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

CELOTTO, A. C. I.; NAZARIO, D.Z.; SPESSOTO, M.A.; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, D.R. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz. J. Microbiol**, v.34, n.4, São Paulo Oct./Dec. 2003.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 3ª. ed. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian;** 2000. (vol.3).

COSTA R.S., OZELA E.F., BARBOSA W.L.R., PEREIRA N.L., JUNIOR J.O.C.S. Physical characterization, chemistry and physic-chemistry of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) dry extract by spray-drying. **Rev. Bras. Farm.**, 90(3): 169-174, 2009

CUNHA WR, MARTINS C, FERREIRA DS, CROTTI AEM, LOPES NP, ALBUQUERQUE S: In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Med** 2003; 69:468–470.

DUTRA, R.C; CAMPOS, M.M; ADAIR, B.C; SANTOS, R.S, CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112. p. 4–29, 2016.

FLOR, A.S.S.O. & BARBOSA, W.L.R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá – PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. I, p.757-768, 2015.

GIRALDI, M. & HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 395-406. 2010.

GOLDENBERG, R. & CHAGAS, E.C.O. *Miconia nordestina* (Metastomataceae), a New Species From Brazil. **Systematic Botany**, V. 39(1), p. 253-259. 2014.

HASRAT JA, DE BACKER JP, VALQUELIN G, VLIETINCK AJ: Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. **Phytomedicine** 1997; 4:56–65.

LIMA, E.S. & ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2008. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **2ª ed. Nova Odessa**, Instituto Plantarum.

MARCUCCI, M.C; WOISKY, R.G; SALATINO, A; Uso de cloreto de Alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo. **Revista Mensagem Doce**, nº 46, maio, 2008. Acesso em: 20/09/2018.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

NONO R.N., BARBONI L., TEPONNO R.B., QUASSINTI L., BRAMUCCI M., VITALI L.A., PETRELLI D., LUPIDI G., TAPONDJOU A.L. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities and phytoconstituents of extracts from the roots of *Dissotis*

thollonii Cogn. (Melastomataceae). **Jornal Sul-Africano de Botânica**, v. 93, p. 19-26, 2014.

OLIVEIRA, ALANE C.; VALENTIM, IARA B.; GOULART, MARIA O. F.; SILVA, CÍCERO A.; BECHARA, ETELVINO J. H.; TREVISAN, MARIA T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Revista Química nova**, v. 32, n. 3, 2009.

OLIVEIRA, O.W. & PETROVICK P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, 20(4), p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, A.K.M.1; MOTA, C.M.G.2; AGNES, D.C. Efeito de diferentes temperaturas na germinação de sementes e no crescimento inicial de plântulas de *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p.755-759, 2014

OLIVEIRA, D.M.S.; LUCENA, E.M.P. O uso de plantas medicinais por moradores de Quixadá–Ceará. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.3, p.407-412, 2015.

PANDEY, P. & DOERKSEN R.J. New Drugs from Natural Products around the World. **Pharmaceutical Sciences**, n. 22, p. 215-216, 2016.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; AMORIM, E.L.C. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v.33, n.2 ,2010, p.288-291.

PEREIRA, J.B.A. et al. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais no centro-sul piauiense. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, p.550-561, 2015.

PIERONI, L. G. et al. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9439–9450, 2011.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63: 1035-1042, 2000.

RE, R.; et al. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REIS, C.; BIERAS, A.C.; SAJO, M.G. Anatomia foliar de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n.3, 2005.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D.C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G.J.; SANTOS,L.C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, V. 11 (1),P. 120–126, 2008.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; DA SILVA, MA; DOS SANTOS, LC; VILEGAS, W. Metabólitos secundários de *Miconia rubiginosa*. **J. Med. Food** **2010**, *14*, 834-839.

ROMERO, R. & MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2002.

SCALCO, C. N.; MUNHOZ, C. L. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade aguda dos extratos brutos das plantas *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, *Chenopodium ambrosioides* L. E *Miconia albicans* Sw. Triana. **Journal of Agronomic Sciences**, v.5, n.2, p.181-194, 2016.

SERPELONI, J. M. et al. Avaliação in vivo da anti clastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo *in vivo* evaluation of anti clastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Biologia**, p. 47–56, 2000.

SERPELONI, J.M.; REIS, M.B.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; DOKKEDAL, A.L.; CÓLUS, I.M.S. In vivo assessment of DNA 218 damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, v. 23, p. 501-7, 2008a.

SERPELONI, J. M.; VILEGAS, W.; VARANDA E. A.; CÓLUS, I. M. *In vivo* evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008b.

SERPELONI, J. M.; BARCELOS, G. R. M.; MORI, M.P.; YANAGUI, K.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; COLLUS, I.M.S. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An *in vitro* analysis *Experimental and Toxicologic Pathology*. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.63, n.5, p. 499-504, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007.

SOARES, L.A.L., ORTEGA G.G., PETROVICK, P.R., SCHMIDT P.C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. **AAPS Pharmsci** **6**, E359-E366, 2005.

SONAGLIO, D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico de produção de fitoterápicos. In: Simões, C.M.O., et al. (Eds.), **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 289–326, 2003.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. 2010. 102f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) –

Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. 2010.

URREA, V.V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.Y.A.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, p.1-6, 2016.

VASCONCELOS TB, CARDOSO AR, JOSINO JB, MACENA RH, BASTOS VP. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? UNOPAR **Cient Cienc Biol Saude**. 2014;16(3):213-9

VASCONCELOS, SML; GOULART, MOF; MOURA, JBF; BENFATO, VMMSB; KUBOTA, LT Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danos oxidativos no sangue humano: os principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova** 2007, 30, 1323-1338.

ZAKARIA Z. A., BALAN T., MAMAT S. S., MOHTARRUDIN N., KEK T. L., SALLEH M. Z. Mechanisms of gastroprotection of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves. **Bmc complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 135, 2015.